

考生編號_____ 分數_____

二〇〇六年國際生物奧林匹亞國手選拔營實作試題

第 D 試場

實驗所需要的器材及藥品，都已放在桌上，請按照下面的清單清點。若有缺少請舉手告訴評審老師。實驗完畢後，請將用過的器材清洗乾淨並放置整齊。

A. 實驗器材：

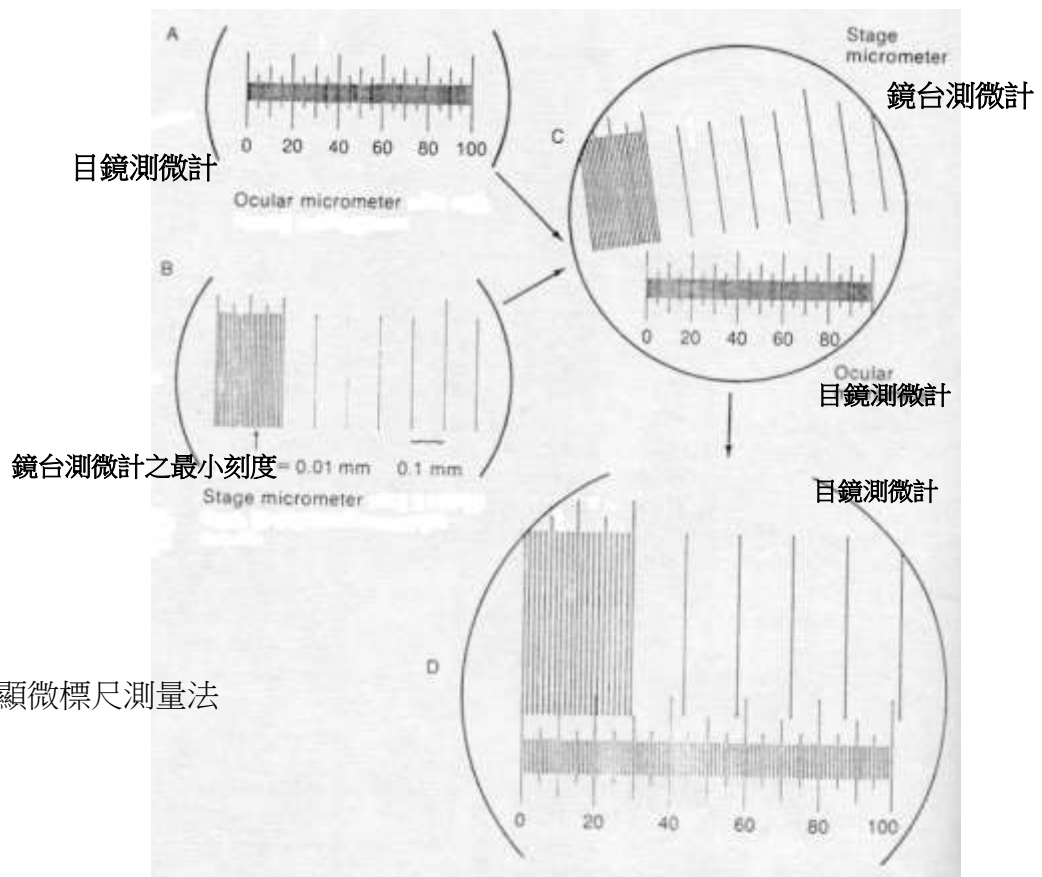
1. A、B、C、D、E 共五管微生物樣本液
2. 載玻片 6 片、蓋玻片 1 片
3. 染色架
4. 染劑二種（甲基藍及賴特吉姆薩染色液，分別置於染色瓶中）
5. 蒸餾水瓶（或蒸餾水置燒杯中，另附吸管）
6. 甲醇
7. 衛生紙
8. 個人用光學顯微鏡（10 倍目鏡附游標尺；具 100 倍物鏡）：1 台/人 照相用光學顯微鏡（具 100 倍物鏡）：2 台(共用)
9. 礦物油（於附滴管瓶中）

※ 請注意：

1. 桌上的藥品及器材用完後，將不再補充。
2. 本試卷（含封面、試題卷）共 7 頁，於交卷時全部繳回。
3. 作答時間 60 分鐘，請於本卷上作答。試題答案可寫至題目背面，但請註明並標上題號。
4. 請於本頁左上角「考生編號」處，填入個人編號。

一、顯微測微計的使用

顯微鏡不僅可用於微小的物體的觀察，並可測量這些物體的大小，顯微測量的方法在生物學上非常重要。在顯微鏡下當然可以直接用透明的塑膠尺測量，但所得的結果不夠精確，因此一般使用顯微標尺測量。顯微標尺為二塊玻片，上面都有刻度，一為圓形的目鏡測微計(Ocular micrometer)，置於顯微鏡目鏡的兩塊鏡片之間，另一玻片如同載玻片，叫做鏡台測微計(Stage micrometer)，使用時才置於載物台上。經由適當的調整，顯微鏡下可以同時看清楚目鏡及載玻片上的標尺，調整兩標尺使二者平行，並使左邊之起點重疊(如圖 1 D)。由左向右仔細觀察，若目鏡中的刻度 15 與鏡台上的刻度 0.1 釐米重合，則目鏡的 15 刻度等於 10 微米，即目鏡測微計上的每一刻度 = $10/15 = 0.66$ 微米。依法類推答題目一。



圖一、顯微標尺測量法

題目一、在不同倍率的物鏡下，將目鏡測微計的最小單位長填入下表中(10%)

	目鏡測微計最小刻劃(格)的長度 (單位：微米)
以 4 倍物鏡觀察時	
以 10 倍物鏡觀察時	
以 40 倍物鏡觀察時	
以 100 倍物鏡觀察時	

二、微生物的染色與觀察

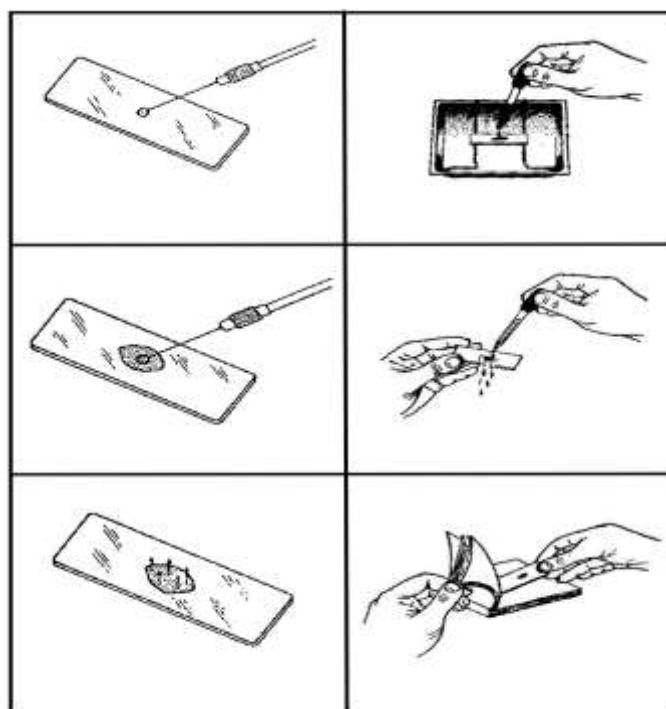
目的：瞭解微生物染色的基本原理與方法，觀察並判斷微生物細胞的形態與大小，顯微鏡各種鏡頭的交換操作。

材料：

1. A、B、C、D、E 共五管微生物樣本液
2. 載玻片 6 片、蓋玻片 1 片
3. 染色架
4. 染劑二種（甲基藍及賴特吉姆薩染色液，分別置於染色瓶中）
5. 蒸餾水瓶（或蒸餾水置燒杯中，另附吸管）
6. 甲醇
7. 衛生紙
8. 個人用光學顯微鏡（10 倍目鏡附游標尺；具 100 倍物鏡）：1 台/人
照相用光學顯微鏡（具 100 倍物鏡）：1 台
9. 礦物油（於附滴管瓶中）

染色方法及步驟：

1. 細菌的簡易染色法 (simple staining)：根據圖一所示進行染色
 - (1) 以接種環分別取 A、B、C、D 四管微生物培養液 1-2 滴置於玻片
 - (2) 以接種環依圓形方向將培養液均勻塗抹之
 - (3) 靜置玻片，風乾之
 - (4) 將玻片放置於染色架上，加數滴甲基藍染劑(methylene blue)蓋住樣本塗抹的乾燥處，作用 30 sec
 - (5) 取蒸餾水清洗玻片
 - (6) 用衛生紙吸除玻片上的水分



圖二、簡易染色法的步驟

2. 在微生物抹片處加一滴礦物油【以顯微鏡 40 倍物鏡調好焦距及視野中心後，旋轉鼻輪到 40 倍與 100 倍鏡頭中間位置加一小滴油，繼續將 100 倍物鏡旋轉浸入油中。**注意：無論什麼情況下，都不可讓其他物鏡鏡頭碰到礦物油**】
3. 於下方的方框中畫出所觀察到的微生物形態並估算其大小
4. 以接種環取 E 管微生物液 1-2 滴置於載玻片，蓋上蓋玻片以 40 倍物鏡觀察
5. 賴特吉姆薩染色法 (Wright Giemsa staining)：
 - (1) 以接種環取 E 管微生物培養液 1-2 滴置於玻片
 - (2) 以接種環依圓形方向將培養液均勻塗抹後，靜置風乾
 - (3) 將玻片置於染色架上，加數滴甲醇固定樣本，10 sec 後流掉甲醇，風乾
 - (4) 在染色架上加數滴賴特吉姆薩染液於玻片樣本上，染色 10 min
 - (5) 以蒸餾水清洗玻片
 - (6) 流掉玻片上的水分後風乾
6. 用顯微鏡以 40 倍物鏡觀察，畫下 E 管的微生物形態並估算其大小

題目二、將顯微鏡下步驟 3 所觀察到的不同形態微生物繪於下方表格中，並推測其大小（需寫出單位）：(20%)

A	B	C	D
大小：	大小：	大小：	

題目三、於照相用顯微鏡下觀察 → 選取一個最佳視野 → 照相記錄 (10%)

題目四、在使用 100 倍物鏡觀察時，為什麼要加礦物油？解釋其原理。(10%)

題目五、觀察細菌除簡易染色法外，也常用負染色法(negative staining)，負染色法與簡易染色法最大差異是使用的染劑不同，簡易法使用鹼性染劑，而負染色法使用酸性染劑，且染劑不會進入細胞、僅作背景的染色。說明這兩種染色法是根據細菌結構組成的何種化學特性所發展出來的。(20%)

題目六、推測 E 管微生物的大小（需寫出單位）(5%)

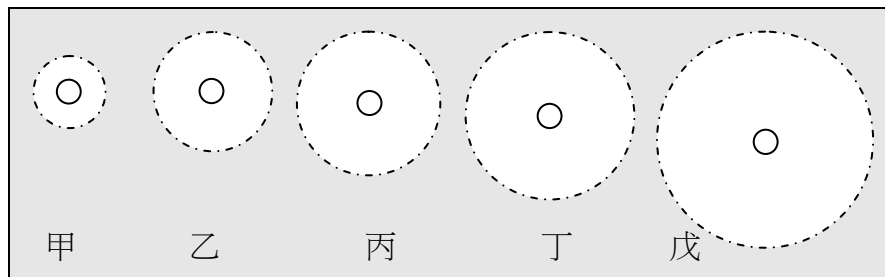
大小：_____

題目七、將用 40 倍物鏡觀察到的 E 管微生物繪圖於下面的方格中：(5%)



題目三：單向免疫擴散法

單向免疫擴散 (single radial immunodiffusion) 法可以用來測定在一樣本液中所含未知蛋白質抗原(X)的濃度。方法是在 56°C 未凝固的洋菜膠中加入一定量的抗血清 (內含辨識抗原 X 的抗體)，充分混合後，倒入培養皿中；待冷卻凝固後，在洋菜膠上打六個同樣大的小孔。甲、乙、丙、丁、戊孔中分別加入同體積已知濃度的抗原，靜置 24 小時後出現沉澱圈樣式如下(圖三)，所得實際結果如表一。



(圖三：只是圖樣，未必照正確比例)

表一：由已知濃度所得的沉澱圈大小

	已知濃度 (mg/ml)	沉澱圈直徑 (mm)	Log10 沉澱圈直徑 (mm)
甲	0.5	1.8	0.26
乙	1.0	3.4	0.52
丙	1.5	6.2	0.79
丁	2.0	11.4	1.05
戊	2.5	21.0	1.32

題目八、請用表一之結果在下面方格紙上作出標準線，作圖計分。(10%)

題目九、現有一未知濃度的樣本液，在稀釋 10 倍後利用單向免疫擴散法測定，放在第六孔中，結果得到的沉澱圈直徑為 4.3 mm ($\log 10 = 0.63$)。請利用你作的標準線，算出此樣本液中所含的 X 抗原濃度。(10%)

答案欄：

閱卷教授簽章_____